

成人からの *Clostridium difficile* の分離及び 毒素原性並びに抗毒素抗体について

金沢大学医学部微生物学講座 (主任: 西田尚紀教授)

三 川 正 人

(昭和55年12月17日受付)

Key words *Clostridium difficile*, Clostridial antibody, Normal flora, Antibiotic-associated pseudomembranous colitis

偽膜性大腸炎 Pseudomembranous colitis (PMC) は、腸管上皮細胞壊死及び白血球、フィブリン、壊死産物などから成る偽膜の形成をみる大腸の非特異性炎症である。本疾患は、1893年 Finney¹⁾ が初めて胃腸吻合術後の重篤な合併症として報告したが、殊に近年は、リンコマイシン (LCM) 及びその誘導体であるクリンダマイシン (CLDM) 投与による本疾患が多数報告されている^{2)~4)}。本疾患の発症原因として、黄色ブドウ球菌、抗生剤、腸管の虚血等⁵⁾が挙げられていたが、1977年 Larson ら⁶⁾が PMC 患者糞便中に細胞障害性毒性を有する物質が存在することを初めて明らかにし、同年引き続き Larson ら⁷⁾及び Rifkin ら⁸⁾は本毒性が *Clostridium sordellii* 抗毒素血清により中和されることを明らかにした。一方 Bartlett ら⁹⁾は、クリンダマイシン投与により腸炎が発症したハムスターの腸管内に同様の毒性物質を証明し、初めて *Clostridium difficile* を分離した。その後 PMC 患者糞便からも *C. difficile* が分離され、且、分離した *C. difficile* の培養液中に *C. sordellii* 抗毒素血清により中和される細胞障害性毒素が存在することが多数の研究者^{10)~14)}により明らかにされ、有毒 *C. difficile* が PMC の主要な原因の1つとして認められるに至った。

抗生剤投与による PMC 発症に関しては、種々の要因が考えられているが、年齢が最も明らかな要因²⁰⁾と考えられ、特に 50 才以上の患者に抗生剤を投与した場合に本疾患が高頻度に発症すると言われている。一方、健康人糞便からの *C. difficile* の分離に関しては、新

生児及び乳児糞便から高頻度に分離される^{15)~17)}と報告されているが、健康成人糞便からはほとんど分離されていない。

以上の点に鑑み、著者は本研究で本症患者が特に老人に多い理由を明らかにすべく、老人と若年者を対比させ、両群の糞便からの *C. difficile* の分離率、分離菌株の毒素原性及び血清中の *C. difficile* 毒素に対する中和抗体の有無を検討した。

材料及び方法

I. 糞便及び血清

被験糞便材料は、糞便採取時までの4週間は抗生剤の投与を受けず、かつ腹部症状の無い成人から得た。若年者の糞便は、本学医学部学生 (22~28才) 149人より得、また老人の糞便は、金沢市内にある A 老人ホームの健康老人 (60~90才) 213人と福井市内にある B 病院の脳血管障害のある入院患者 (50~80才) 69人より得た。糞便材料は採取後直ちに検索するように努め、やむを得ない場合は水素ガスで置換した嫌気ジャー (トミー精工) に入れ 4℃ で保存し、5時間以内に検索に供した。血清材料は若年者 44人と老人 41人から糞便採取と同時期に採血後、遠心分離して得た。

II. 糞便からの *C. difficile* の分離及び同定

C. difficile 分離用培地としては、George らの CCFA 培地²⁰⁾を改良した変法 CCFA 平板培地を用いた。本培地作製に際しては、表1のIの基礎培地を 120℃、15分間蒸気滅菌後、50℃に保温し、これにIIの

Isolation and Toxicity of *Clostridium difficile* and Antibody in Adults. Masato Mikawa, Department of Bacteriology (Director: Prof. S. Nishida), School of Medicine, Kanazawa University.

Table 1. Composition of modified CCFA medium

I. Basal medium	
Proteose peptone No. 2 (Difco)	4.0 g
Fructose	0.6 g
Na ₂ HPO ₄	0.5 g
KH ₂ PO ₄	0.1 g
NaCl	0.2 g
MgSO ₄ (anhydrous)	0.01g
Agar	2.0 g
1% Neutral red solution in ethanol	0.3 ml
Distilled water	100 ml
	pH 7.2
II. Supplements	
50% Egg yolk solution	10 ml
Cycloserine(Sigma) solution(30 mg/ml)	1 ml
Cefoxitin(Merk) solution(1 mg/ml)	1 ml
Lysozyme(Seikagaku) solution(1 mg/ml)	1 ml

各液を添加し平板を作製した。この際、Lysozyme 溶液は 0.45 μ m pore size の membrane filter (Japan Millipore) を用いて濾過滅菌した。作製後水素ガスで置換した嫌気ジャーに 18～24 時間あらかじめ保存して培地中に含まれる酸素を抜く様にし、使用直前に取り出して用いた。嫌気的に作製した希釈液 (Prereduced diluent)²¹⁾ を用いて糞便を 10 倍段階希釈し、10⁻¹ から 10⁻⁵ までのそれぞれの希釈液 0.1 ml を上記の変法 CCFA 平板培地に塗抹し、水素ガスで置換した嫌気ジャーで 37℃、48 時間培養した。培養後、レシチネース反応陰性の、中央部が低く隆起し辺縁が粗の R 型集落で、長波長 (3650 Å) 紫外線ランプ (マナスルライト、マナスル化学) の照射で黄金色の蛍光を発する集落を *C. difficile* の集落として菌数を測定した²⁰⁾。それぞれの糞便材料について上記の *C. difficile* と思われる 2 個の集落を釣菌し、さらに変法 CCFA 平板培地と抗生剤を除いた変法 CCFA 平板培地で雑菌の混入のないことを確かめた後、VPI Anaerobe Laboratory Manual²²⁾ の方法に準じて生物化学性状試験 (糖分解性状、Gas chromatography による揮発性及び不揮発性の有機酸の判定) を行ない *C. difficile* であることを同定確認した。

III. *C. difficile* 分離菌株の毒素産生

肝片加肝ブイオンで前培養した菌液 0.2 ml を 0.5 % ブドウ糖加肉カスブイオン Chopped-meat-glucose medium (CMG)²²⁾ に接種し、嫌気ジャーを用い、窒素

ガス 80 %、炭酸ガス 10 %、水素ガス 10 % の存在下で 37℃ 7 日間培養した。培養後、培養液 pH が 6.0 から 7.5 の間にあることを確認した (pH 6.0 以下では毒素は産生されない) 後、4℃、10000rpm 5 分間遠心後上清液をとり、0.45 μ m pore size の membrane filter (Japan Millipore) で濾過滅菌したものを毒素液とした。

IV. 糞便抽出液

0.05M リン酸緩衝食水 (pH 7.0) で 10 % (V/V) 糞便液を作り、4℃、10000rpm 10 分間遠心後上清液を上記の如く濾過滅菌したものを糞便抽出液とし、細胞毒性試験に供した。

V. 細胞毒性試験

金沢大学がん研究所ウィルス部門、波田野基一教授より分与を受けた Baby hamster kidney cell (BHK-21/WI-2)²³⁾ を用いて細胞毒性試験を行なった。本細胞の培養には EC-5 培地 (ウシ胎児血清 (大日本製薬) 5 % (V/V), Lillacilin (田辺製薬) 100 μ g/ml を含む Eagle minimal essential medium (日本製薬)) を用いた。トリブシン処理後、20 万個/ml になる様 EC-5 培地で調製した BHK-21/WI-2 細胞浮遊液を Nunclon micro test plate (Nunc, Roskilde, Denmark) の各 Well に 50 μ l (10000 個/well) 分注し、炭酸ガスが 5 % になる様調整された自動炭酸ガス細胞培養装置 (Forma, U. S. A.) 内で 37℃ 24 時間培養し、細胞が well の底面に付着して monolayer を形成したものを使用した。EC-5 培地を用いて毒素液及び糞便抽出液を 2 倍段階希釈し、それぞれの希釈液 50 μ l を各 well に接種し、Microshaker (トミー精工) で振盪した後、再び培養装置に戻し、接種後 6, 24, 48 時間後、細胞を観察し、屈折性の変化、円形化、monolayer の崩壊などで示される細胞変性 Cytopathic effect (CPE) の有無を判定した。すべての細胞が円形化する最高希釈の逆数を細胞毒性単位 Cytotoxic unit (CU) /50 μ l とした。

VI. 細胞毒性中和試験

C. difficile 毒素を中和する *C. sordellii* 抗毒素血清は、*C. sordellii* 3703 株を用いて作製したトキソイドで家兎を免疫することにより得た。EC-5 培地を用いて適度に希釈した毒素液 50 μ l と EC-5 培地を用いて 32 倍希釈した *C. sordellii* 抗毒素血清を等量に混合し、37℃、30 分間反応させた後、その 50 μ l を上記の如く調製した BHK 細胞浮遊液 50 μ l に接種して 24 時間培養後 CPE の有無を判定した。なお対照としては、EC-5 培地で 32 倍に希釈した健康家兎血清を用いた。

VII. *C. difficile* 毒素に対するヒト血清中の中和活性

C. difficile 毒素液として *C. difficile* ATCC 17859 株の CMG 7 日間培養液 (16384CU/50 μ l) を用いた。EC-5 培地を用いて本毒素液を 2 倍段階希釈し、その 25 μ l と等量のヒト血清を混合し、37℃、30 分間反応させた後、上記の如く調製した BHK 細胞浮遊液 50 μ l に接種して 24 時間培養後、CPE の有無を判定し、中和活性を調べた。毒素液と血清の混合液が培養細胞に対し何らの変化を示さない時、中和活性陽性と判定した。

VIII. ヒト血清の IgG 画分の調整

被験血清の 40% (W/V) 硫酸分画の沈澱部分を溶解し、DEAE セファデックス A-50 (Pharmacia, Sweden) カラムクロマトグラフィーにより精製²⁴⁾したものを IgG 画分として用いた。

成 績

I. 糞便からの *C. difficile* 分離率

表 2 に見る如く被験 A, B, C, D 群合計 431 人中合計 49 人 (11.4%) の糞便から *C. difficile* が分離

された。老人においては、A 群と B 群の施設の間に *C. difficile* の分離率に差が認められた。A, B 両群の老人合計 282 人のうち 26 人 (9.2%) から *C. difficile* が分離された。若年者については、C, D の学生群の間には *C. difficile* の分離率に大きな差は認められなかった。C, D 両群の若年者合計 149 人のうち 23 人 (15.4%) から *C. difficile* が分離された。

II. 糞便中の *C. difficile* 菌数及び分離菌株の毒素原性

分離 *C. difficile* 総菌株 49 株中 34 株 (69.4%) が有毒株であった。若年者及び老人糞便からの *C. difficile* 分離菌株 (若年者菌群, 老人菌群) 中、有毒株の占める割合は、おのおの 69.6%, 69.2% を示し両菌群の間に差は認められなかった。有毒株の毒性は両菌群ともに 64~8192CU/50 μ l に渡り、有毒株中強毒株 (1024CU/50 μ l 以上) の占める割合は、おのおの 56.3%, 55.6% を示し、この点においても両菌群の間に差は認められなかった。

C. difficile 陽性者糞便 1g あたりの菌数は、若年者においては最少菌数 $10^{2.0}$, 最多菌数 $10^{6.1}$, 老人においては最少菌数 $10^{2.5}$, 最多菌数 $10^{6.9}$ を示した (表 3, 4)。

Table 2. Isolation frequency of *C. difficile* from the fecal specimens of younger and aged adults

Group	Age	Number of specimens tested	Number of <i>C. difficile</i> -positive specimens(%)	Number of toxigenic <i>C. difficile</i> -positive specimens(%)
A*	60-90	213	15 (7.0)	10 (4.7)
B	50-80	69	11 (15.9)	8 (11.6)
C	22-28	40	5 (12.5)	4 (10.0)
D	22-30	109	18 (16.5)	12 (11.0)

* A: Inhabitants in A old-aged home in Kanazawa.

B: Inpatients in B hospital in Fukui.

C, D: Students of different classes of Medical School, Kanazawa University.

Table 3. Number and toxigenicity of *C. difficile* in the feces of younger adults

Number of <i>C. difficile</i> in 1 g of feces	Number of fecal specimens	Number of fecal specimens having <i>C. difficile</i> showing cytotoxicity of				
		0	64-128	256-512	1024-2048	4096-8192
10^2 level	3	0	0	2	1	0
10^3 level	9	2	0	2	2	3
10^4 level	6	3	2	1	0	0
10^5 level	2	1	0	0	1	0
10^6 level	3	1	0	0	1	1

また *C. difficile* 陽性若年者及び老人の糞便 1g あたりの平均菌数はおおの $10^{4.1}$, $10^{4.6}$ を示し、老人の方がやや高い値を示した。すなわち、*C. difficile* 陽性若年者 23 人中 5 人 (21.7%), 同老人 26 人中 11 人 (42.3%) が糞便 1g あたり 10^5 以上の *C. difficile* を保有していた。

糞便 1g あたり 10^5 以上の有毒 *C. difficile* を有する *C. difficile* 陽性者は、若年者 3 人、老人 8 人であり、*C. difficile* 陽性若年者 (23 人) 及び老人 (26 人) のそれぞれ 13.0%, 30.7% の割合を示し、*C. difficile* 陽性者に関しては、老人において高頻度に存在することが示された。しかしながら、これらの多数の有毒 *C. difficile* 陽性者の総被験者に対する割合は、若年者 (149 人) においては 2.0%, 老人 (282 人) においても 2.8% にすぎず、両群の間に差は認められなかった。

Ⅲ. 糞便中の *C. difficile* 毒素

C. difficile が分離された糞便材料 (49 検体) 及び *C. difficile* が分離されなかった糞便材料 (100 検体) の抽出液について細胞毒性を測定した。その結果、*C.*

difficile の分離されなかった糞便材料の抽出液中には細胞障害性毒素を認めることができなかったことは当然のことながら、 10^6 以上の有毒 *C. difficile* を含む糞便材料の抽出液をも含めて、いずれの抽出液にも全く細胞毒性を認めることができなかった。

Ⅳ. ヒト血清中の *C. difficile* 毒素に対する中和活性

若年者群では、有毒 *C. difficile* 保菌者 16 人中 14 人 (87.5%) が、また無毒 *C. difficile* 保菌者においても 7 人中 4 人 (57.9%) と高い頻度で血清中に中和活性が認められた (表 5)。

しかしながら、*C. difficile* を保有していない若年者においては、21 人中 4 人 (19.0%) の血清中に *C. difficile* 毒素に対する中和活性を認めるに過ぎなかった。一方老人群では、*C. difficile* の多寡に関わりなくいずれの血清中にも中和活性を認めなかった。有毒 *C. difficile* 陽性の若年者で中和活性が認められた 14 人のうち 2 人の血清 $50\mu\text{l}$ は、 $4\text{CU}/50\mu\text{l}$ の毒性を中和したに過ぎなかったが、中和活性を有した残りの若年者のほとんどの血清 $50\mu\text{l}$ は、 $128 - 256\text{CU}/50\mu\text{l}$

Table 4. Number and toxigenicity of *C. difficile* in the feces of aged adults

Number of <i>C. difficile</i> in 1 g of feces	Number of fecal specimens	Number of fecal specimens having <i>C. difficile</i> showing cytotoxicity of				
		0	64-128	256-512	1024-2048	4096-8192
10^2 level	5	3	0	2	0	0
10^3 level	5	0	0	1	2	2
10^4 level	5	2	0	2	1	0
10^5 level	4	1	0	1	1	1
10^6 level	7	2	2	0	1	2

Table 5. *C. difficile* toxin-neutralizing activity of serum

Group	Number of sera tested	Number of sera having <i>C. difficile</i> toxin-neutralizing activity(%)
Younger adults		
Toxigenic <i>C. difficile</i> -positive in feces	16	14 (87.5)
Nontoxigenic <i>C. difficile</i> -positive in feces	7	4 (57.1)
<i>C. difficile</i> -negative in feces	21	4 (19.0)
Aged adults		
<i>C. difficile</i> -positive in feces	20	0
<i>C. difficile</i> -negative in feces	21	0

の毒性を中和した。無毒 *C. difficile* 保菌者 1 人及び *C. difficile* を保有しない 1 人の血清 50 μ l は、1024CU/50 μ l もの高い毒性を中和した。また、*C. difficile* を保有しないにも拘らず、血清中に中和活性を認めた人の糞便について、その後 1 ヶ月にわたり *C. difficile* の分離をくりかえし試みたが、本菌を分離することができなかった。

中和活性を示した血清数検体の蛋白分画を試みた結果、いずれも中和活性が IgG 画分に含まれることが判明した。

考 察

C. difficile は抗生剤投与による PMC の主要な原因菌として今日広く認められている^{10)~14)16)}。糞便からの *C. difficile* 分離用培地については、近年 George ら²⁰⁾、Willey ら¹⁹⁾がおのおの CCFA、C&C 培地を考案した。同培地は選択用抗生剤として Cycloserine (CS), Cefoxitin (CFX) が用いられており、CCFA 培地において CS 500 μ g/ml, CFX 16 μ g/ml, C&C 培地においては CS 250 μ g/ml, CFX 10 μ g/ml が添加されている。本実験に先だち、CCFA 培地と C&C 培地を比較検討した。糞便由来の菌株の集落の発育は両培地において差異を認めなかったが、ATCC 菌株は CCFA 培地上において明らかに発育が劣り、小さな集落を形成した。しかしながら、いずれの菌株においても CCFA 培地上の集落が黄金色の蛍光を明瞭に発し、C&C 培地上の集落に比べて鑑別が容易であることが判った。以上の結果から、本実験においては CS 300 μ g/ml, CFX 10 μ g/ml を添加した変法 CCFA 培地 (M - CCFA) を用いた。また、Lysozyme 添加が *C. difficile* の孢子の発芽を促進するという事実 (未発表) に基き、Lysozyme 10 μ g/ml を添加した。

抗生剤非投与成人糞便からの *C. difficile* の分離に関しては、George ら¹⁸⁾は 137 人中 4 人 (3%) の糞便から *C. difficile* を分離しているが、Larson ら¹⁶⁾は 11 人中いずれの糞便からも *C. difficile* を分離できなかった。Willey ら¹⁹⁾は、彼らの考案した C&C 培地を用い抗生剤非投与成人 60 人の糞便を検索したが、全く *C. difficile* を分離できなかった。著者の成績では、抗生剤非投与成人 431 人中 49 人 (11.4%) の糞便から *C. difficile* が分離された。この分離率は、前述の他の研究者の成績に比べ明らかに高い値を示している。その主な原因としては民族的な差が考えられる。*C. perfringens* については既に糞便中の菌数が民族により異なっている²⁵⁾²⁶⁾と報告されている。また、CCFA 培地は *C. difficile* が本培地上で蛍光を発することか

ら、その検出に好適な選択培地であるが、その CCFA 培地に含まれる抗生剤 (CS, CFX) の濃度を減量した為、*C. difficile* の増殖が選択的に増大されたことも無視できないように思われる。

抗生剤非投与成人糞便中における *C. difficile* の菌数に関しては、 $10^{3.3} \sim 10^{3.9}$ /g 糞便と報告されている¹⁸⁾²⁰⁾が、本研究では 10^5 /g 糞便以上の保菌者が相当数存在した。しかも PMC 患者糞便中の平均菌数 $10^{5.8}$ /g 糞便¹⁹⁾以上の保菌者が、総被験若年者 149 人中 3 人 (2.0%)、総被験老人 282 人中 10 人 (3.5%) に認められた。また、抗生剤非投与成人からの *C. difficile* 分離株は、PMC 患者糞便分離株と同様すべてが有毒株であると報告されている¹⁸⁾²⁰⁾が、本研究においては総分離菌株 49 株中 34 株 (69.4%) が有毒株であった。

Bartlett ら¹¹⁾は、PMC 患者糞便に関して 10^3 /g 糞便以上の *C. difficile* が分離される場合、その糞便中には *C. difficile* 毒素が認められ、しかもその際毒素量と菌数が比例することを示した。しかし本研究の結果、抗生剤非投与成人においては、有毒 *C. difficile* が 10^5 /g 糞便以上存在する糞便抽出液中にも全く毒性は認められなかった。同様の現象は、ヒト腸管内の *C. perfringens* の菌数と α 毒素の関係においてもみられている²⁶⁾²⁷⁾が、有毒 *C. perfringens* が多数存在する腸管内に α 毒素が全く検出されない理由については、 α 毒素破壊因子²⁷⁾や糞便の α 毒素産生抑制作用²⁸⁾が考えられている。PMC においては、*C. difficile* 毒素が本疾患発症に関与していると考えられている^{10)~14)16)28)}故に、腸管内における本菌の毒素産生機序に関与してさらに一層の研究が必要と考えられる。

C. difficile 毒素に対する中和抗体は、若年健康成人においては、*C. difficile* 保菌者 23 人中 18 人 (78.3%) に認められ、また *C. difficile* 非保菌者においても 21 人中 4 人 (19.0%) の血清中に認められた。これに反し、抗生剤非投与老人においては、*C. difficile* の多寡に関わりなく本抗体は全く認められなかった。血清中の中和抗体 (IgG) の腸管における役割は今の所明らかではないが、PMC の発症が老人に多い²⁾³⁾ということを考えれば、本抗体の有無が本症発症に関し、なんらかの関連を有すると考えられる。

結 論

変法 CCFA 培地を用いて抗生剤非投与成人 431 人 (若年成人 149 人、老人 282 人) の糞便から *C. difficile* の分離を試みた結果、若年者 23 人 (15.4%)、老人 26 人 (9.2%) の合計 49 人 (11.4%) の

糞便から本菌を分離した。糞便中の菌数に関しては、若年者、老人ともに糞便 1g あたり $10^2 \sim 10^6$ 台であったが、平均菌数は若年者で $10^{4.1}/g$ 糞便、老人で $10^{4.6}/g$ 糞便であり、老人でやや高い値を示した。若年者及び老人糞便からの *C. difficile* 分離株中、有毒株の占める割合はいずれも約 70 % であり、両者の間に差は認められず、また分離株の毒性の強弱についても若年者及び老人糞便分離株の間に差は認められなかった。 $10^5/g$ 糞便以上の有毒 *C. difficile* 保菌者は、若年者 3 人、老人 8 人であり、*C. difficile* を保有する若年者 (23 人) 及び老人 (26 人) に対する割合は、それぞれ 13.0 %, 30.7 % となり、老人でいくらか高い値を示した。但し、総被験者に対する割合は 2.0 %, 2.8 % と両者で差は認められなかった。一方、*C. difficile* の多寡に関わりなく、いずれの糞便からも *C. difficile* 毒素は検出されなかった。また、有毒 *C. difficile* を保有するほとんどの若年者の血清中には *C. difficile* 毒素に対する中和抗体が認められたが、老人の血清中には全く認められなかった。

稿を終るに臨み、懇篤な御校閲を戴きました恩師西田尚紀教授に心から謝意を捧げます。また、実験の遂行にあたり終始直接御指導御助言を戴きました中村信一助教授はじめ、多大な御協力を戴きました御生物学教室員各位に深く感謝の意を表します。さらに、BHK 細胞を御分与戴き、細胞毒性試験を御指導下さいました金沢大学がん研究所波田野基一教授、糞便採集に御協力戴きました金沢医科大学老年病科関本博教授に謝意を捧げます。

文 献

- 1) Finney, J. M. : Gastroenterostomy for cicatrizing ulcer of the pylorus. *Bull. Johns Hopkins Hosp.*, **4**, 53-55 (1893)
- 2) Tedesco, F. J., Barton, R. W. & Alpers, D. H. : Clindamycin-associated colitis : a prospective study. *Ann. Intern. Med.*, **81**, 429-433 (1974)
- 3) Gurwith, M. J., Rabin, H. R., Love, K. & the Cooperative Antibiotic Diarrhea Study Group : Diarrhea associated with clindamycin and ampicillin therapy : preliminary results of a cooperative study. *J. Infect. Dis.*, **135**, S104-S110 (1977)
- 4) Neu, H. C., Prince, A., Neu, C. O. & Garvey, G. J. : Incidence of diarrhea and colitis associated with clindamycin therapy. *J. Infect. Dis.*, **135**, S120-S125 (1977)
- 5) Bartlett, J. G. & Gorbach, S. L. : Pseudomembranous enterocolitis (antibiotic-related colitis). *Adv. Intern. Med.*, **22**, 455-476 (1977)
- 6) Larson, H. E., Parry, J. V., Price, A. B., Davis, D. R., Dolby, J. & Tyrrell, D. A. J. : Undescribed toxin in pseudomembranous colitis. *Br. Med. J.*, **1**, 1246-1248 (1977)
- 7) Larson, H. E. & Price, A. B. : Pseudomembranous colitis : presence of clostridial toxin. *Lancet*, **2**, 1312-1314 (1977)
- 8) Rifkin, G. D., Fekety, F. R., Silver, Jr. J. & Sack, R. B. : Antibiotic-induced colitis : implication of a toxin neutralised by *Clostridium sordellii* antitoxin. *Lancet*, **2**, 1103-1106 (1977)
- 9) Bartlett, J. G., Onderdonk, A. B., Cisneros, R. L. & Kasper, D. L. : Clindamycin-associated colitis due to a toxin-producing species of *Clostridium* in hamsters. *J. Infect. Dis.*, **136**, 701-703 (1977)
- 10) Bartlett, J. B., Chang, T. W., Gurwith, M., Gorbach, S. L. & Onderdonk, A. B. : Antibiotic-associated pseudomembranous colitis due to toxin-producing clostridia. *New Engl. J. Med.*, **298**, 531-534 (1978)
- 11) Bartlett, J. G., Moon, N., Chang, T. W., Taylor, N. & Onderdonk, A. B. : Role of *Clostridium difficile* in antibiotic-associated pseudomembranous colitis. *Gastroenterology*, **75**, 778-782 (1978)
- 12) George, W. L., Sutter, Y. L., Goldstein, E. J. C., Ludwig, S. L. & Finegold, S. M. : Aetiology of antimicrobial agent-associated colitis. *Lancet*, **1**, 802-803 (1978)
- 13) George, R. H., Symonds, J. M., Dimock, F., Brown, J. D., Arabi, Y., Shinagawa, N., Keighley, M. R. B., Alexander-Williams, J. & Burdon, D. W. : Identification of *Clostridium difficile* as a cause of pseudomembranous colitis. *Br. Med. J.*, **1**, 695 (1978)
- 14) Keighley, M. R. B., Burdon, D. W., Arabi, Y., Alexander-Williams, J., Thompson, H., Young, D., Johnson, M., Bentley, S., George, R. H. & Mogg, G. A. G. : Randomised controlled trial of vancomycin for pseudomembranous colitis and postoperative diarrhea. *Br. Med. J.*, **2**, 1667-1669 (1978)

- 15) Hall, I. G. & O'Toole, E. : Intestinal flora in new-born infants : with a description of a new pathogenic anaerobe, *Bacillus difficilis*. Am. J. Dis. Child., **49**, 390-402 (1935)
- 16) Larson, H. E., Price, A. B., Honour, P. & Borriello, S. P. : *Clostridium difficile* and the aetiology of pseudomembranous colitis. Lancet, **1**, 1063-1066 (1978)
- 17) Snyder, M. L. : Further studies on *Bacillus difficilis* (Hall and O'Toole). J. Infec. Dis., **60**, 223-231 (1937)
- 18) George, W. L., Sutter, V. L. & Finegold, S. M. : Antimicrobial agent-induced diarrhea-A bacterial disease. J. Infec. Dis., **136**, 822-828 (1977)
- 19) Willey, S. H. & Bartlett, J. G. : Cultures for *Clostridium difficile* in stools containing a cytotoxin neutralized by *Clostridium sordellii* antitoxin. J. Clin. Microbiol., **10**, 880-884 (1979)
- 20) George, W. L., Sutter, V. L., Citron, D. & Finegold S. M. : Selective and differential medium for isolation of *Clostridium difficile*. J. Clin. Microbiol., **9**, 214-219 (1979)
- 21) Nakamura, S., Serikawa, T., Yamakawa, K., Nishida, S., Kozaki, S. & Sakaguchi, G. : Sporulation and C₂ toxin production by *Clostridium botulinum* type C strains producing no C₁ toxin. Microbiol. Immunol., **22**, 591-596 (1978)
- 22) Holdeman, L. V., Cato, E. & Moore, W. E. C. : Anaerobe Laboratory Manual, 4th ed., p79-106, Anaerobe Laboratory Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, 1977
- 23) Chang, T. W., Lauermann, M. & Bartlett, J. G. : Cytotoxicity assay in antibiotic-associated colitis. J. Infec. Dis., **140**, 765-770 (1979)
- 24) Yagi, Y., Marier, P. & Pressman, D. : Two different antiinsulin antibodies in guinea pig antisera. J. Immunol., **89**, 442-451 (1962)
- 25) Nakagawa, M. & Nishida, S. : Heat resistance and α -toxigenicity of *Clostridium perfringens* strains in normal intestines of Japanese. Japan. J. Microbiol., **13**, 133-137 (1969)
- 26) Yamagishi, T., Serikawa, T., Morita, R., Nakamura, S. & Nishida, S. : Persistent high number of *Clostridium perfringens* in the intestines of Japanese aged adults. Japan. J. Microbiol., **20**, 397-403 (1976)
- 27) Goudie, J. R. : The nature of a neutralizing substance for *Clostridium welchii* alpha-toxin in faeces. J. Pathol. Bacteriol., **78**, 17-28 (1959)
- 28) Nakamura, S., Nakashio, S., Inamatsu, T., Nishida, N., Taniguchi, N. & Nishida, S. : Toxigenicity of *Clostridium difficile* isolates from patients and healthy adults. Microbiol. Immunol., **24**, 995-997 (1980)

Isolation and Toxigenicity of *Clostridium difficile* and Antibody in Adults Masato Mikawa, Department of Bacteriology (Director: Prof. S. Nishida), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920. — J. Jusen Med. Soc., **90**, 13–20 (1981).

Key words: *Clostridium difficile*, Clostridial antibody, Normal flora, Antibiotic-associated pseudomembranous colitis.

Abstract

A total of 431 fecal specimens of 149 younger and 213 aged healthy adults, and 69 aged adults with cerebrovascular disease but no gastrointestinal disease were examined for the isolation of *C. difficile*. *C. difficile* was obtained from 49 fecal specimens, and isolation frequencies of *C. difficile* were 15.4% in healthy younger adults, 7.0% in healthy aged adults, and 15.9% in aged adults with cerebrovascular disease. Thirty-four (about 70%) of 49 *C. difficile* isolates produced cytotoxin which was neutralized by *C. sordellii* antitoxin in vitro; in both of the younger and aged adults approximately 30% of *C. difficile* isolates were nontoxigenic. Cytotoxicities of toxigenic isolates from younger adults were as much as those from aged adults, ranging between 64 to 8192 CU/50 μ l. The number of *C. difficile* in feces ranged between 10^2 and 10^6 level/g of feces in both of younger and aged adults. The level of 10^5 or more of *C. difficile* in 1 g of feces, however, occurred more frequently among the fecal specimens of aged adults than among those of younger adults, that is, from 11 (42.3%) of 26 aged adults and 5 (21.7%) of 23 younger adults having *C. difficile* in their feces, showing that the mean concentrations of *C. difficile* in feces, when detected, were $10^{4.1}$ /g in younger adults and $10^{4.6}$ /g in aged adults. No fecal extracts showed cytotoxicity, no matter how abundant toxigenic *C. difficile* was in feces. Antibody against *C. difficile* toxin was found in most of sera obtained from younger adults carrying toxigenic *C. difficile*, but not in sera of aged adults, no matter how abundantly they had toxigenic *C. difficile* in feces.